

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN 4

(11)Publication number : 10-265377
 (43)Date of publication of application : 06.10.1998

(51)Int.CI. A61K 31/155
 A61K 31/16

(21)Application number : 09-090205
 (22)Date of filing : 24.03.1997

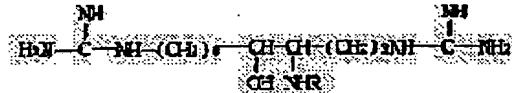
(71)Applicant : POLA CHEM IND INC
 (72)Inventor : NAMAKO KIYOMI
 MIKI TOYOHICO
 NOZAWA AKIRA
 ITO TAKAO
 GOTO MASAHIRO
 NAKAJIMA TAKUJI
 MAJIMA TOSHIRO

(54) ANTIFUNGAL AGENT AND ITS PRODUCTION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an antifungal agent capable of curing a fungus disease by including a guanidinyl derivative.

SOLUTION: This antifungal agent contains a compound of the formula (R is H or guanidinyloctylcarbonyl) [e.g. 1,13-bis(guanidinyl)-4-(8-guanidinyloctylcarbonylamino)-5-hydroxytridecane] as an active component. The compound of the formula is effective in curing superficial fungus diseases such as trichophytoniasis, Malassezia furfur and sporotrichosis, and visceral fungus diseases such as Aspergillus. The compound of the formula is obtained by culturing Streptomyces sp. POL-1142 belonging to a Streptomyces genus and purifying the cultured product with a chromatography. The antifungal agent can control not only growth of Eumycetes but also inflammation caused by Eumycetes.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-265377

(43)公開日 平成10年(1998)10月6日

(51)Int.Cl.
A 6 1 K 31/155
31/16

識別記号
AD Z

F I
A 6 1 K 31/155
31/16

AD Z

審査請求 未請求 請求項の数8 FD (全6頁)

(21)出願番号 特願平9-90205

(22)出願日 平成9年(1997)3月24日

(71)出願人 000113470
ポーラ化成工業株式会社
静岡県静岡市弥生町6番48号
(72)発明者 生子 清美
神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560 ポーラ
化成工業株式会社戸塚研究所内
(72)発明者 三木 豊彦
神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560 ポーラ
化成工業株式会社戸塚研究所内
(72)発明者 野沢 曜
神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560 ポーラ
化成工業株式会社戸塚研究所内

最終頁に続く

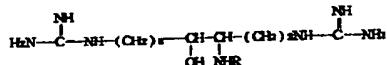
(54)【発明の名称】 抗真菌剤及びその製造方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 本発明はこの様な状況下に行われたものであって、新規の抗真菌剤を提供することを課題とする。

【課題の解決手段】 一般式(I)に表される化合物又は生理的に許容されるこれらの塩からなる抗真菌剤を提供する。この抗真菌剤を含有する医薬組成物は表在性真菌症及び深在性真菌症の治療・予防に優れた作用を有する。

【化1】



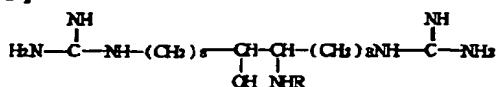
一般式(I)

(但し、式中Rは水素原子又はグアニジニルオクチルカルボニル基を表す。)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式(I)に表される化合物又は生理的に許容されるこれらの塩からなる抗真菌剤。

【化1】

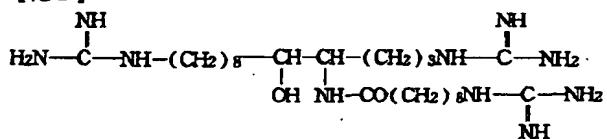


一般式(I)

(但し、式中Rは水素原子又はグアニジニルオクチルカルボニル基を表す。)

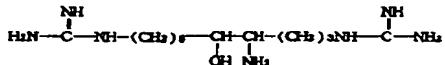
【請求項2】 一般式(I)に表される化合物が、1, 13-ビス(グアニジニル)-4-(8-グアニジニルオクチルカルボニルアミノ)-5-ヒドロキシトリデカン(化合物1)又は4-アミノ-1, 13-ビス(グアニジニル)-5-ヒドロキシトリデカン(化合物2)の何れかである、請求項1に記載の抗真菌剤。

【化2】



化合物1

【化3】



化合物2

【請求項3】 真菌症が表在性真菌症である、請求項1又は2に記載の抗真菌剤。

【請求項4】 表在性真菌症が、トリコフィトン症、マラセティア・ファファ症又はスポルトリコス症である、請求項3に記載の抗真菌剤。

【請求項5】 真菌症が、深在性真菌症である、請求項1又は2に記載の抗真菌剤。

【請求項6】 深在性真菌症が、アスペルギルス症である、請求項5に記載の抗真菌剤。

【請求項7】 請求項1~6の何れか一項に記載の抗真菌剤を有効成分とする真菌症の治療又は予防用の医薬組成物。

【請求項8】 ストレプトマイセス属に属する、ストレプトマイセス・スピーシスPOL-1142を培養し、培養液をイオン交換クロマトグラフ、ODSカラムクロマトグラフで精製することを特徴とする、請求項1~6の何れか一項に記載の抗真菌剤の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、抗真菌剤及びその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 抗真菌症は、完治しにくい疾病の一つであり、様々な抗真菌剤が開発されているが、真菌症を完璧にしうる薬剤は未だ得られていない。詳細に見てみると、真菌症には、水虫、タムシ、シラクモ、白癬等のトリコフィトンに起因する疾病、癬風等のマラセティア・ファファに起因する疾病、スポロトリコス症に代表される表在性真菌症と、アスペルギルス症やカンジダ肺炎等に代表される深在性真菌症が存在し、表在性真菌症の治療は硝酸ミコナゾール等のイミダゾール系抗真菌剤

10 やブテナフィン等のベンジルアミン系の抗真菌剤が用いられているが、「水虫の薬ができればノーベル賞がとれる」と言う言葉が存在するように、菌種による感受性の違いや耐性菌の存在のために十分な効果を発揮しているとは言えず、深在性の真菌症の治療薬としては、毒性の非常に高いアンホテリシンBがあるのみで、事実上は治療手段なしと言うような状況下にあった。即ち、抗真菌作用を有する化合物の登場が待っていた。

【0003】 一方、後記一般式(I)に表される化合物は既知の化合物であって、抗生物質としての作用は知られているが、表在性真菌症及び深在性真菌症の病原菌に対して優れた抗真菌作用を有していること、及びこれを有効成分として含有する医薬組成物が、これらの真菌症の治療や予防に有用であることは全く知られていなかった。又、この物質はストレプトマイセス・バルブス(*Streptomyces parvus*)が生産する事は知られていたが、これとは異なる菌種である、栃木県の土壤より分離されたストレプトマイセス・スピーシスPOL-1142が生産することは知られていなかった。

【0004】 更に、一般式(I)に表される化合物が一30 酸化窒素合成阻害作用を有すること、真菌症の治療又は予防において一酸化窒素合成阻害作用が極めて好ましい作用であることは全く知られていなかった。

【0005】

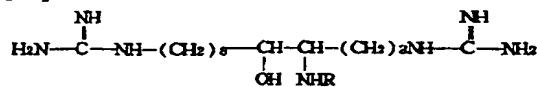
【発明が解決しようとする課題】 本発明はこの様な状況下に行われたものであって、新規の抗真菌剤を提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】 この様な状況に鑑みて、本発明者らは新規抗真菌剤を求めて鋭意研究を重ねた結果、一般式(I)に表される化合物及び/又は生理的に許容されるこれらの塩にその様な作用があることを見だし、発明を完成させるに至った。以下、本発明について実施の形態を中心に詳細に説明する。

【0007】

【化4】



一般式(I)

50 (但し、式中Rは水素原子又はグアニジニルオクチルカ

3

ルボニル基を表す。)

[0008]

【発明の実施の形態】

(1) 本発明の抗真菌剤

本発明の抗真菌剤は一般式（I）に表される化合物又は生理的に許容されるこれらの塩からなる。一般式（I）に表される化合物は、既知の化合物であり、抗生物質として、黄色ブドウ状球菌等の病原菌に対して有効であることが既に知られている。一般式（I）に表される化合物としては、例えば、1, 13-ビス（グアニジニル）-4-（8-グアニジニルオクチルカルボニルアミノ）-5-ヒドロキシトリデカン（化合物1）又は4-アミノ-1, 13-ビス（グアニジニル）-5-ヒドロキシトリデカン（化合物2）等が挙げられる。又、生理的に許容される塩としては、例えば、塩酸、硫酸、硝酸、磷酸等の鉱酸塩、クエン酸、シュウ酸等の有機酸塩、炭酸塩等が例示できる。本発明の抗真菌剤は、ストレプトマイセス属に属する、ストレプトマイセス・スピーシスPOL-1142を培養し、濾過によって培養液を得、必要に応じ水-ブタノールで液液抽出し溶媒を溜去した後、これをイオン交換クロマトグラフ、ODSカラムクロマトグラフで精製することにより、化合物1を製造することができ、これを塩酸等の酸を用いて加水分解することにより、化合物2が製造できる。化合物2は本発明の抗真菌剤の活性母核であるため、この化合物を化学修飾することによって更なる抗真菌剤を開発することも可能である。尚、ストレプトマイセス・スピーシスPOL-1142は受託番号FERM P-15678で工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。この菌は放線菌の中でストレプトマイセス属に属し、気菌糸色調は白から黄色であり、気菌糸先端は直鎖状で、胞子表面は円滑、裏面色調は茶色で、メラニン様色素を生成する菌株と要約される。その特徴について次に列挙する。これらの性質に鑑みると、従来知られている、本発明の一般式（I）に表される化合物の生産菌である、SF2425株とは明らかに異なることが判る。即ち、POL-1142株は、胞子連鎖が直線上で、胞子表面が平滑であり、シーカロース硝酸塩寒天培地で普通の生育を示し茶色を呈し、グルコース・アスパラギン寒天培地で良好な生育を示し茶色を呈し、オートミール・寒天培地で良好な生育を示し黄色を呈し、硝酸塩の還元性、脱脂乳の凝固が陽性であるのに対し、SF2425がそれぞれ螺旋状、棘を有し、微弱な生育で色はなく、微弱な生育で色はなく、普通の生育で色がなく、陰性であることから、明らかにこの菌株とは異なることが判る。

【0009】(1) 形態學的特徵

基生菌糸は長く伸張し、良く分岐し、通常の条件下では分断しない。気菌糸はスターチ寒天、グリセロール・アスパラギン寒天、リンゴ酸・カルシウム寒天で豊富に着生し、更に直線上に伸張し先端から長い胞子鎖鎖を築

く。電子顕微鏡下での観察では、胞子は長円筒型で表面は円滑である。胞子は通常20~50個連鎖する。胞子嚢、運動性胞子、菌核等は観察されない。

[0010] (口) 各種培地上の性質

本発明で用いるPOL-1142株の各種培地上での生育状態を表1に示す。ここで色の記載で()内に示した表記は、コンテイナー・コーポレーション・オブ・アメリカ社製の「カラー・ハーモニー・マニアル」の色票に準じて決定したものである。尚、観察は、これらの培地で28°C 21日培養後に行つた。

10 で28℃21日培養後に行った。

{0011}

【表1】

【0 0 1 2】 (八) 生理的性質

- ・生育温度範囲：イースト・寒天培地において $15\sim37^{\circ}\text{C}$ の温度範囲で生育し、 $25\sim30^{\circ}\text{C}$ で良好に生育する。

- ・ゼラチンの液化：陰性
 - ・スタークの加水分解：陽性
 - ・硝酸塩の還元：陽性
 - ・脱脂乳のペプトン化：陽性
 - ・脱脂乳の凝固：陽性
 - ・メラニン様色素の生成：トリプトン・イースト液体培地、チロシン寒天培地、ペプトン・イースト・鉄寒天培地で陽性を示す。

【0013】(二) 炭素源の利用

・利用する:D-ダブルコース、D-キシロース、L-アラビノース、L-ラムノース、ラフィノース、メリビオース

・疑わしい:D-フラクトース、D-マンニトール

・利用しない：シュークロース、セルロース

〔0014〕(示)細胞壁組成

ベッカーラの方法 (Appl. Microbiol. 13:236, 1965) により分析した結果、細胞壁成分中のジアミノピメリル酸は I.I.型であった。

【0015】本発明化合物の製造に於ける培養条件は、通常のストレプトマイセス属の菌の培養条件に準じれば良く、例えば、炭素源としてブドウ糖、デキストリン、でんぶん、糖蜜、動・植物油を用い、窒素源として肉エキス、大豆粉、小麦胚芽コーンステーブリーカー、ペプトン、酵母エキス、硝酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素などを用いればよい。その他、必要に応じて無機塩類などを加えうる。かかる培地で好気的条件で15～37℃、より好ましくは25～30℃で培養すればよい。本発明の化合物は、培養条件によっても異なるが、2～4日間の培養で最高蓄積量に達する。かくして得られる一般式(I)に表される化合物及び／又は生理的に許容されるこれらの塩は優れた抗真菌作用と一酸化窒素合成阻害作用を有する。

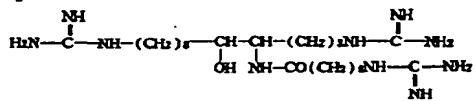
【0016】(2) 本発明の医薬組成物

50 本発明の医薬組成物は、上記抗真菌剤を含有するもので

あって、真菌症の治療及び予防に用いることができる。真菌症には、例えば、ミズムシ、タムシ、シラクモ、白癬などのトリコフィトンに起因する疾病、癪風等のマラセティア・ファファに起因する疾病、スポットリコーシス症等の表在性真菌症とアスペルギルス症等の深在性真菌症があるが、本発明の医薬組成物はこれらの何れにも有効である。特に、深在性真菌症に対する有効な医薬がない現状では、本発明の医薬組成物を深在性真菌症の治療乃至は予防に用いることは特に好適である。本発明の医薬組成物は、その投与経路は特に限定されず、注射剤、経口投与剤、皮膚外用剤等が例示できる。これらで好ましいものは、注射剤と皮膚外用剤である。本発明の医薬組成物では、これらの医薬組成物で用いることのできる任意成分を含有することができる。これら任意成分としては、例えば、賦形剤、結合剤、被覆剤、滑沢剤、糖衣剤、崩壊剤、增量剤、香味矯臭剤、乳化・可溶化・分散剤、安定剤、pH調整剤、等張剤、ワセリンやマイクロクリスタリンワックス等のような炭化水素類、ホホバ油やゲイロウ等のエステル類、牛脂、オリーブ油等のトリグリセライド類、セタノール、オレイルアルコール等の高級アルコール類、ステアリン酸、オレイン酸等の脂肪酸、グリセリンや1,3-ブタンジオール等の多価アルコール類、非イオン界面活性剤、アニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、両性界面活性剤、エタノール、カーボボール等の増粘剤、防腐剤、紫外線吸収剤、抗酸化剤、色素、粉体類等が例示できる。これらの任意成分と一般式(I)に表される化合物及び/又は生理的に許容されるこれらの塩とを通常の方法で処理することによって製造できる。

【0017】

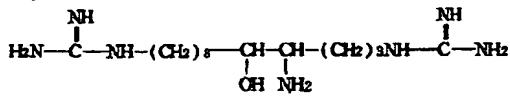
【化5】



化合物1

【0018】

【化6】



化合物2

【0019】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明について更に詳細に説明するが、本発明がこれら実施例にのみ限定されないことは言うまでもない。

【0020】<実施例1>

製造例

ストレプトマイセス・スピーシスPOL-1142を種培地として、酵母エキス1%、ブドウ糖1%の組成から

なる培地を用い、これを100ml三角フラスコに分注し121℃で15分間オートクレープ中で滅菌した。これにストレプトマイセス・スピーシスPOL-1142株の斜面寒天培養の1~2白金耳量を接種し、28℃で3日間振とう培養した。これにブドウ糖3%、大豆粉2%、ペプトン0.5%、塩化ナトリウム0.5%、炭酸カルシウム0.35%の組成からなる培地を31仕込み、121℃で15分間滅菌した5lジャー・ジャー・メンター5基に消泡剤アンチフロスを100μl加え、10 60mlづつ接種し、28℃で72時間、250r.p.m.で通気攪拌して培養した。培養後、濾過補助剤としてけい藻土を加え、濾過し濾液を得た。これをワットマン陽イオン交換樹脂CM52を充填したカラムに流し吸着させ、20mM酢酸ナトリウム水溶液を流して洗浄した後、20mM酢酸ナトリウム水溶液-1M塩化ナトリウム含有20mM酢酸ナトリウム水溶液(100:0→0:100)を流し吸着物を溶出させた。溶出物をダイヤイオンHP-20を充填したカラムに流し吸着させ、これを水-メタノール混液(100:0→0:100)を流し溶出させた。更に、この溶出物をミリポア陽イオン交換樹脂を充填したカラムに吸着させ、20mM酢酸ナトリウム水溶液-1M塩化ナトリウム含有20mM酢酸ナトリウム水溶液(100:0→0:100)で溶出させ、溶出分を更にODS分種カラムクロマトグラフィー(溶出液:アセトニトリル:水:トリフルオロ酢酸=20:80:0, 0.05)で分取精製し化合物1を37mg得た。これの10mgを常法に従い加水分解し、同様に処理・精製し、化合物2を4mg得た。

【0021】<実施例2>上記化合物1、2について抗真菌作用を調べた。糸状菌をサブロー寒天培地(日本製薬製;ペプトン1.0%、ブドウ糖4.0%、寒天1.5% pH5.9)の斜面培地に27℃で2週間培養して、分生子を充分作らせた後、0.05% (w/v) ツイーン80を含む滅菌生理食塩水に分生子を懸濁させ、滅菌ガーゼで濾過をした。濾液は10⁶分生子/mlになるように希釈し、接種菌液とした。検体を10mg/mlになるように滅菌水で希釈した。これを元液とし、2ホールドで希釈し、滅菌シャーレに100μlづつ分注し、これにサブロー寒天培地10mlを加え、良く混和した後固化させた。これらのシャーレにミクロプランターを用いて、接種菌液を5μl接種し、可視で明らかに発育を抑える最少薬物濃度(MIC)を求めた。尚、培養条件は、27℃1週間であった。結果をMIC(μg/ml)として表1及び表2に示す。これより本発明の抗真菌剤は優れた抗真菌作用を有することが判る。

【0022】
【表1】
【0023】
【表2】

7

8

菌種	化合物1	化合物2	ビーフォナゾール	アンフォラジンB
アメニキルス・ニカー アメニキルス・アルテネット スギトリコシス・シェンキー	0.2 0.025 0.39	25 6.25 50	1.56 3.12 12.5	0.78 3.12 25

【0024】<実施例3>サブローター液体培地に1%になるようにツイーン60を加えた液体培地に37℃、2日間培養した菌液を 10^6 細胞/mLになるように希釈し接種菌液とした。実施例2と同様に2ホールド希釈液を調整し、滅菌シャーレに $100\mu\text{l}$ づつ分注し、これに試験培地(バクト イースト ナイトロジエンペース 0.67%、バクト カシトン 0.5%、ツイーン60 0.1%、100×ビタミン溶液(BME) 5.0%、ブドウ糖 2.0%、寒天 2.0%) $1*$

* 0mL加え、良く混和後固化させた。これらのシャーレにミクロプランターを用いて、接種菌液を $5\mu\text{l}$ 接種し、37℃で5日間培養後、可視で明らかに発育を抑えられる最少薬物濃度(MIC)を求めた。結果をMIC($\mu\text{g}/\text{mL}$)として表3に示す。本発明の抗真菌剤は取り分けマラセティア・ファファに対して抗真菌作用を有していることが判る。

【0025】

【表3】

菌株	化合物1	テルビナフィン	アフラフィン	ビーフォナゾール
M. furfur TINM1848	0.39	6.25	3.12	0.78
M. furfur TINM2782	0.2	1.56	6.25	0.39
M. furfur IAM40081	0.2	1.56	1.56	0.39

【0026】<実施例4>一酸化窒素合成阻害作用を、マクロファージ(J774.1)を用いて調べた。即ち、即ち、マクロファージをイーグルの最小培地で希釈しウェルあたり 1×10^4 個になるようにウェルに分注した。これに最終濃度が $100\text{ng}/\text{mL}$ になるようにLPSを加え、更に最終濃度が $50\text{U}/\text{mL}$ になるようIFN- γ を加えた。同時に検体を各ウェルの最終ボリュームが $100\mu\text{l}$ になるように加えた。産生された※

※一酸化窒素量をグリースの方法によって求めた。結果を一酸化窒素の産生量として表4に示す。この表より、本発明の抗真菌剤は一酸化窒素の合成阻害作用を有することが判る。即ち、本発明の抗真菌剤は真菌の発育を抑えるのみならず、真菌によって引き起こされる炎症も抑える作用に優れることが判る。

【0027】

【表4】

検体	化合物1 (1000U)	化合物1 (100U)	対照
	0.8 μM	2.1 μM	3.8 μM

【0028】

【発明の効果】本発明によれば、新規の抗真菌剤を提供

することができる。

【表1】

9

10

培地	発育／裏面の色	気菌糸／色	可溶性色素
イースト麦芽寒天	良好 茶 (3ng)	なし	黄 (2pe)
オートミル寒天	良好 黄 (2ne)	貧弱 淡いピーソ (7cb)	黄 (2nc)
スターチ寒天	良好 茶 (2pl)	豊富 淡い黄 (5ig)	黄 (2pe)
ケリヤローラ・アスパラキン 寒天	良好 鈍い黄 (2ng)	豊富 淡い黄 (3gc)	黄 (3pc)
ケルカス・アスパラキン 寒天	良好 茶 (7pl)	普通 白 (10ba)	黄 (3pc)
ペアトン・イースト鉄 寒天	良好 鈍い茶 (3ml)	なし	濃茶
10シ寒天	良好 濃茶	貧弱 白 (10cb)	濃茶
ショーコロス・硝酸塩 寒天	普通 茶 (4pi)	貧弱 白 (10dc)	薄い黄 (3ic)
リノゴ酸・カルシウム 寒天	良好 濃茶 (3pn)	豊富 白 (10dc)	オレンジ (21c)
栄養寒天	普通 茶 (3le)	なし	茶 (3pg)

【表1】

30

菌種	化合物1	アンフォテリンB	ナイスタチン
アスペルギルス・ニガチ	0. 1未満	1. 56	6. 25
アシシリカム・シトリウム	12. 5	6. 25	12. 5
アカルネリア・アルテナート	0. 39	6. 25	12. 5
トリコフィトン・マンタク・ロフィディス	6. 25	3. 12	3. 12
トリコフィトン・ルブ'ルム	1. 56	0. 78	3. 12
スズロトリコラクス・シェンキー	0. 39	100以上	25

フロントページの続き

(72) 発明者 伊藤 隆男

神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560 ポーラ
化成工業株式会社戸塚研究所内

(72) 発明者 後藤 正弘

神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560 ポーラ
化成工業株式会社戸塚研究所内

(72) 発明者 中島 琢自

神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560 ポーラ
化成工業株式会社戸塚研究所内

(72) 発明者 馬島 敏郎

神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560 ポーラ
化成工業株式会社戸塚研究所内